

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-231500

⑮ Int. Cl.⁸

C 07 K 13/00
15/12
C 12 P 21/02

識別記号

ZNA

庁内整理番号

8318-4H
8318-4H
8214-4B※

⑬ 公開 平成2年(1990)9月13日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全15頁)

⑭ 発明の名称 新規なGTP結合蛋白質及びその産生方法

⑯ 特 願 平1-115831

⑰ 出 願 平1(1989)5月9日

優先権主張 ⑱ 昭63(1988)5月31日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭63-133548

㉑ 発 明 者 高 井 義 美 兵庫県神戸市須磨区竜が台7-5-6

㉒ 発 明 者 近 藤 淳 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内

㉓ 発 明 者 松 井 泰 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内

㉔ 発 明 者 寺 西 豊 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内

㉕ 出 願 人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

㉖ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称

新規なGTP結合蛋白質及びその産生方法

2 特許請求の範囲

(1) GTP結合活性及びGTP加水分解活性を有し、該GTP結合活性がN-エチルマレイミドで阻害される性質を有する下記アミノ酸配列を含み、分子量が約22Kダルトンであることを特徴とするGTP結合蛋白質。

Thr-Ile-Glu-Asp-Ser-Tyr

(2) 下記アミノ酸配列で表わされることを特徴とするGTP結合蛋白質。

Met-Arg-Glu-Tyr-Lys

Leu-Val-Val-Leu-Gly

Ser-Gly-Gly-Val-Gly

Lys-Ser-Ala-Leu-Thr

Val-Gln-Phe-Val-Gln

Gly-Ile-Phe-Val-Glu

31 Lys-Tyr-Asp-Pro-Thr-35

36 Ile-Glu-Asp-Ser-Tyr-40

41 Arg-Lys-Gln-Val-Glu-45

46 Val-Asp-Cys-Gln-Gln-50

51 Cys-Met-Leu-Glu-Ile-55

56 Leu-Asp-Thr-Ala-Gly-60

61 Thr-Glu-Gln-Phe-Thr-65

66 Ala-Met-Arg-Asp-Leu-70

71 Tyr-Met-Lys-Asn-Gly-75

76 Gln-Gly-Phe-Ala-Leu-80

81 Val-Tyr-Ser-Ile-Thr-85

86 Ala-Gln-Ser-Thr-Phe-90

91 Asn-Asp-Leu-Gln-Asp-95

96 Leu-Arg-Glu-Gln-Ile-100

```

101 105
Leu-Arg-Val-Lys-Asp-
106 110
Thr-Glu-Asp-Val-Pro-
111 115
Met-Ile-Leu-Val-Gly-
116 120
Asn-Lys-Cys-Asp-Leu-
121 125
Glu-Asp-Glu-Arg-Val-
126 130
Val-Gly-Lys-Glu-Gln-
131 135
Gly-Gln-Asn-Leu-Ala-
136 140
Arg-Gln-Trp-Cys-Asn-
141 145
Cys-Ala-Phe-Leu-Glu-
146 150
Ser-Ser-Ala-Lys-Ser-
151 155
Lys-Ile-Asn-Val-Asn-
156 160
Glu-Ile-Phe-Tyr-Asp-
161 165
Leu-Val-Arg-Gln-Ile-
166 170
Asn-Arg-Lys-Thr-Pro-

```

```

171 175
Val-Glu-Lys-Lys-Lys-
176 180
Pro-Lys-Lys-Lys-Ser-
181 184
Cys-Leu-Leu-Leu-

```

(3) 請求項2に記載のGTP結合蛋白質をコードするDNAを含有するDNA断片を、発現用ベクターのプロモーターの下流に存在するクロニング部位に導入し、ついで該DNA断片を導入した発現ベクターを宿主に導入して同宿主を培養し、該蛋白質を生成蓄積させ、これを取得することを特徴とするGTP結合蛋白質の産生方法。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、ras発ガン遺伝子産物に対し抑制的に働く新規なGTP結合蛋白質(Smg p21)及びそれを組換えDNA技術により宿主中で産生させる方法に関する。

(従来の技術及び発明が解決しようとする問題点)

哺乳動物の個体を構成する個々の細胞は、細胞外から絶えず情報を受け、その刺激に应答すると

いう形式で個体としての役割を果たしている。

いわゆる第1次情報伝達物質が各細胞にもたす情報を受ける細胞膜情報転換ユニットは、受容器(レセプター)、伝達器(トランスジューサー)及び効果器(エフェクター)の3種類の蛋白質で構成されており、GTP(グアノシン5-三リン酸)結合蛋白質(以下、「G蛋白質」という)はその内トランスジューサーとして機能している。即ち、レセプターが細胞外からの第1次情報を受けると、不活性型のGDP-G蛋白質に作用し、G蛋白質に結合しているGDPがGTPに変換され、活性型のGTP-G蛋白質となる。そして、この活性型のGTP-G蛋白質がエフェクターに作用し、エフェクターから細胞内に情報(第2次情報)が伝達される。

従来、G蛋白質については、種々の蛋白質(サブユニット)から構成されている高分子量のG蛋白質(分子量約4万)の機能等が良く知られているが、最近低分子量G蛋白質の存在が明らかにされてきた。

低分子量G蛋白質、即ち分子量が2~2.5万のG蛋白質は少くとも15種類存在するが、本発明者らの一部は、先に分子量2.4万のG蛋白質(Smg p25A)及び分子量2.2万のG蛋白質(Smg p21; 22Kダルトン)をSDS-PAGEにおいて単一の蛋白質として精製することに成功したこと、そしてSmg p25AのG蛋白質についてはその詳細を報告した(実験医学、Vol. 6, No. 5, 第34-42頁, 1988; ジャーナル オブ ザ バイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem.), 263, 2897-2904, 1988)。

しかしながら、未だこれらG蛋白質の構造については明らかにされておらず、その機能についても全く不明であった。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、分子量2.2万のG蛋白質について着目し、その全構造を決定して該G蛋白質の機能を解明すべく鋭意検討を重ねた結果、該G蛋白質を精製し、その部分アミノ酸配列

を決定してプローブを作成し、GプロテインのcDNAライブラリーから分子量2.2万のGプロテインのcDNAをクローン化し、その塩基配列を決定することにより初めて分子量2.2万のGプロテインを単一分子種として得ることに成功した。

しかし、Smg p 21は従来の蛋白化学的手法を用いての精製では数10 μ g程度の量しか精製できず、大量に用いて、例えば抗ガン剤等の薬理試験に使用することは困難であった。また、人為的に変異を導入し、抗ras活性の強いSmg p 21変異蛋白質を作ること、まだ不可能とされていた。

そこで本発明者らは、該Gプロテインを遺伝子工学的な手法により大量に生産すべく鋭意検討を重ねた結果、該Gプロテインをコードする遺伝子を初めて分離取得し、該遺伝子を含んだ発現ベクターを得るに至り、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明の要旨は、GTP結合活性及びGTP加水分解活性を有し、該GTP結合活性がN-エチルマレイミドで阻害される性質を有する下

イ、ヒドロキシアパタイト（生化学工業社製）カラムクロマトグラフィー、Mono Q HR 5/5（ファルマシアLKB社製）カラムクロマトグラフィー、Mono S HR 5/5（ファルマシアLKB社製）カラムクロマトグラフィー及び再びMono Q HR 5/5カラムクロマトグラフィーにかけることによって、精製された分子量約2.2KダルトンのGプロテインを得ることができる。

この精製された分子量約2.2KダルトンのGプロテインは、GTP結合活性及びGTP加水分解活性を有する。このGTP結合活性はN-エチルマレイミドによって阻害されるが、その際にジチオスレイトールを存在させておくとその阻害はブロックされる。

また、このGプロテインは、抗ARF（ADP-ribosylating Factor）ポリクローナル抗体及び抗ras p 21モノクローナル抗体との交叉反応は示さない。

本発明においては、上記精製Gプロテインの部

記アミノ酸配列（Thr-Ile-Glu-Asp-Ser-Tyr）を含み、分子量が約2.2Kダルトンであることを特徴とするGTP結合蛋白質、第1図に示すアミノ酸配列で表わされることを特徴とするGTP結合蛋白質及びそれをコードするDNAを含有するDNA断片を、発現用ベクターのプロモーターの下流に存在するクローニング部位に導入し、ついで該DNA断片を導入した発現ベクターを宿主に導入して同宿主を培養し、該蛋白質を生成蓄積させ、これを取得することを特徴とするSmg p 21の産生方法に存する。

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明のGプロテインは、哺乳動物の細胞の細胞膜に存在する。

例えば後述の実施例に示すように、牛の脳を破砕し、細胞膜画分を得、コール酸ナトリウムによって粗膜画分を抽出して、これをUltragel AcA-44（LKB社製）カラムクロマトグラフィー、フェニルセファロースCL-4B（ファルマシアLKB社製）カラムクロマトグラフ

分アミノ酸配列を決定してプローブを作成し、常法に従い、全ポリARNAから調製したcDNAライブラリーより分子量約2.2KダルトンのGプロテインのcDNAをクローン化した。

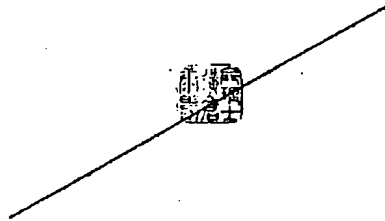
クローン化されたcDNAから、分子量約2.2KダルトンのGプロテインをコードするDNA断片を取得し、その塩基配列を決定した（第3図）。

この塩基配列から、本発明のGプロテインは、184個のアミノ酸残基からなる蛋白質であることが分かった。また、本発明のGプロテインは、N末端の44個のアミノ酸残基は、ras蛋白質と約77%の相同性を有し、全体でも約53%の相同性を有する。そして、ras蛋白質がエフェクターと作用すると推定されている第35-40番目の領域（Thr-Ile-Glu-Asp-Ser-Tyr）と同じ配列（第35-40番目）を有していることが分かった。

次に本発明のGプロテインの産生方法について説明する。

本発明において用いられる第3図で表わされる

DNA断片は、該DNA断片に含まれるDNAによってコードされる物質がSmg p21と同様の生理活性を有する物質をコードするものであれば、該塩基配列の一部が置換もしくは削除され、又は塩基が付加された塩基配列であってもよい。例えば、第1図に示すアミノ酸配列において、第12番目のグリシン(Gly)がバリン(Val)に、第38番目のアスパラギン酸(Asp)がアラニン(Ala)に、また第40番目のチロシン(Tyr)がリジン(Lys)に置換されたアミノ酸配列をコードするDNA等が挙げられ、これら以外にも下記第1表に示したようなアミノ酸の置換が考えられる。



このような改変CプロテインをコードするDNAは合成オリゴヌクレオチドを用いる公知の部位特異的変異誘起や制限酵素により得られる切断部位と適切な合成オリゴヌクレオチドを連結させる等の方法により得られる。

本発明の発現ベクターは、上記のようにして得られたSmg p21をコードするDNAを転写制御できる位置にプロモーターを含有する。

使用するプロモーターは、宿主中で発現可能ならば何でもよいが、更には制御可能なものが望ましい。

例えば大腸菌、枯草菌等の微生物を宿主とするときは、発現ベクターは、プロモーター、リボソーム結合配列、Smg p21遺伝子、転写終結因子、及びプロモーターを制御する遺伝子より成ることが好ましい。

プロモーターとしては、大腸菌、ファージ等由来のもの、例えばトリプトファン合成酵素オペロン(trp)、ラクトースオペロン(lac)、リボプロテイン(lpp)、rocA、ラムダフ

第1表

元の残基	代表的な置換基
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

ファージP₁, P₂, T5初期遺伝子P₂₃, P₂₄プロモーター等が挙げられる。これらは化学合成により作成されたものでもよい。また、lac (trp:lac)、trc (trp:lac)、plac (ファージ:大腸菌)等のバイブリッドプロモーターでもよい。

リボソーム結合配列としては、大腸菌、ファージ等由来のものでも良いが、合成により作成したコンセンサス配列、例えば、AGGA GGT
SD配列

TTAA等の配列を持ったものが好ましい。

Smg p21遺伝子は、そのまま使用しても良いが、部位特異的変異(バイオテクノロジー(BIO TECHNOLOGY) July, 6 36-639, (1984))等により余分なDNA配列(non-coding領域)を除いたものが好ましい。

転写終結因子は必ずしも必要ではないが、 ρ 非依存性のもの、例えばlppターミネーター、trpオペロンターミネーター、リボソームRNA

遺伝子のターミネーター等を有している方が好ましい。

また発現ベクターは、通常のプラスミドを使用しても良いが大腸菌または枯草菌で多コピー数になるプラスミド、例えば pBR322 系プラスミド、pUB110 系プラスミド等を使用したものが好ましい。

さらに、これら発現に必要な因子の発現プラスミド上での配列順序は、5' 側上流から、プロモーター、SD 配列、Smg p21 遺伝子、構造遺伝子、転写終結因子の順に並ぶことが望ましい。また転写の制御に必要なリプレッサー遺伝子、マーカー遺伝子（薬剤耐性等）及びプラスミド複製開始等の順序はとくに限定はされない。また、SD 配列、Smg p21 遺伝子を接続したものをプロモーター下流に縦に並べて連結させる事により、転写効率を高める事ができる。その結果、生成量及び品質の向上が望める。

酵母を宿主とする場合は、酵母由来のプロモーター、例えばピルビン酸キナーゼ (pYK)、ホ

スホグリセロキナーゼ (pGK) 等の配列の支配下に Smg p21 遺伝子を接続し、酵母内に導入することにより、Smg p21 を産生することができる。

宿主の形質転換方法としては、大腸菌では Molecular Cloning (モレキュラー クローニング)、250-253, (1982) 記載の方法、また枯草菌では Molec. Gen. Genet. (モレキュラー ジェネラル ジェネティクス)、168, 115-115, (1979) 及び Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. (プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス ユーエスエー)、44, 1072-1078, (1958) 記載の方法、また酵母では Methods in Yeast Genetics (メソッズ イン イースト ジェネティクス) 121-122 ページ (1986) に記載のリチウム クロライド法等の常法を用いることができる。

形質転換体の培養方法としては、大腸菌、枯草

菌、酵母とも通常の培養を行い得る培地 (Molecular Cloning (モレキュラー クローニング)、68-73, (1972)) ; Methods in Yeast Genetics (メソッズ イン イースト ジェネティクス)、163 ページ (1986)) を用いることができる。また培養温度も 15~42℃で行えばよいが、好ましくは大腸菌、枯草菌等の場合は熱ショック蛋白質等の発現誘導の起らない範囲 (15~25℃) で行い、酵母の場合は 30℃前後で行うのがよい。

また、真核細胞、例えば動物細胞においては次のようなものが好ましい。

プロモーターとしては、SV40 初期プロモーター、SV40 後期プロモーター、アポリポプロテイン E 遺伝子のプロモーター、アポリポプロテイン A-1 遺伝子のプロモーター、熱ショック遺伝子のプロモーター (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス ユー

エスエー)、78, 7038-7042, (1981))、メタロチオネイン遺伝子のプロモーター (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 77, 6511-6515, (1980))、HSV TK プロモーター、アデノウイルスのプロモーター (Ad 2 主要後期プロモーター (Ad 2 MLP プロモーター))、レトロウイルスの LTR (Long Terminal Repeat) 等が挙げられるが、SV40 プロモーター及びメタロチオネイン遺伝子のプロモーターが好ましい。

発現ベクターは 5' スプライス部位 (5' splice junction donor site)、イントロン及び 3' スプライス部位 (3' splice junction acceptor site) からなるスプライス配列 DNA (エキソン-イントロン接合部位、同接合部位周辺には共通の塩基配列が見出されており、イントロン領域が常に GT の 2 塩基 (ドナー部位) で始まり、そして AG の 2 塩基 (アクセプター部位)

で終了するといういわゆるGT/AG則が成立する。

このようなスプライス配列DNAは、発現ベクター中に1以上存在してもよく、またその位置は、Smg p 21遺伝子の上流であっても、また下流であってもよい。

上記スプライス配列DNAの具体例としては、ウサギβ-グロビン遺伝子のエクソン2及びエクソン3 (Science (サイエンス), 26, 339, (1979) 参照)、メダロチオネイン遺伝子のプロモーター、エクソン1、2及び3並びにイントロンA及びBを含有するマウスメダロチオネイン-1遺伝子 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス ユーエスエー), 77, 6513, (1980) 参照) 中に存在するスプライス配列DNAが挙げられる。また、5'及び3'スプライス部位は同一の遺伝子に由来する必要はなく、たとえば、アデノウイルスDNA中に含まれる5'スプライス

部位と18可変領域遺伝子に由来する3'スプライス部位を連結した配列を使用できる。

本発明の発現ベクターは、さらにポリアデニル化部位を含有する。ポリアデニル化部位は、Smg p 21遺伝子の下流に存在する。ポリアデニル化部位の具体例としては、SV40 DNA、β-グロビン遺伝子又はメダロチオネイン遺伝子に由来するものが挙げられる。また、β-グロビン遺伝子のポリアデニル化部位及びSV40 DNAのポリアデニル化部位が連結したものであってもよい。

本発明の発現ベクターは、形質転換体の選択を可能とする優性な選択マーカーを有していてもよい。発現ベクター中に選択マーカーがなくても、二重形質転換法 (cotransformation) により、形質転換された本発明の動物細胞を選択できる。

このような選択マーカーとしては、MTX (メソトレキセート) 耐性を与えるDHFR遺伝子、HAT媒体中での形質転換tk⁻株の選択を可能と

するヘルペス・シンプレックスウイルス (HSV) のtk遺伝子、3'-デオキシストレブタミン抗生物質G418に対する耐性を付与する大腸菌のトランスポゾンTn5からのアミノグリコシド3'-ホスフォトランスフェラーゼ遺伝子、重層増殖による形態的区別を可能にするウシバビローマウイルス遺伝子、gpr1遺伝子等が挙げられる。

また、二重形質転換法により、本発明の発現ベクターで形質転換した動物細胞を選択するには、上記した選択マーカーとなる遺伝子を含有するプラスミドその他のDNAを発現ベクターと一緒に形質転換し、選択マーカーの発現による上記した表現形質により、形質転換細胞を選択できる。

発現ベクターは、大腸菌等の細胞由来の複製起点を有するプラスミド断片を含有すると、細菌中でのクローニングが可能となり有利である。このようなプラスミドとしてはpBR322、pBR327、pML等が挙げられる。

発現ベクターに使用されるプラスミドベクターの具体例としては、SV40初期プロモーター、

ウサギのβ-グロビン遺伝子に由来するスプライス配列DNA、ウサギのβ-グロビン遺伝子からのポリアデニル化部位、SV40初期領域からのポリアデニル化部位並びにpBR322からの複製起点及びアンピシリン耐性遺伝子を含有するpKCR (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (プロシーディング ナショナル アカデミー オブ サイエンス ユーエスエー), 78, 1528, (1981) 参照)、pKCRのpBR322部分をpBR327部分で置換し、ウサギβ-グロビン遺伝子のエクソン3中に存在するEco RI部位をHind III部位に変えたpKCR H2 (Nature (ネイチャー), 307, 605 参照)、BPV遺伝子及びメダロチオネイン遺伝子を含有するpBPV MT1 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80, 398, (1983) 参照) 等が挙げられる。

発現ベクターで形質転換される動物細胞としては、CHO細胞、COS細胞、マウスL細胞、マ

ウスC127細胞、マウスPM3A細胞等が挙げられる。

本発明の発現ベクターの動物細胞への移入はトランスフェクション法、マイクロインジェクション法としては、Cao-PO₄ (Virology (ヴァイロロジー), 52, 456-467, (1973)) が最も一般的である。

移入により形質転換された動物細胞の培養は、常法により浮遊培地又は固着培地中に行なうことができる。

培地としては、MEM、RPMI 1640等が一般的である。

産生された蛋白の分離精製は、微生物により生産した場合と同様にしてできる。

(発明の効果)

本発明の分子量が約22KダルトンのGプロテインのDNAは、上述の通り、発ガン遺伝子であるras遺伝子と非常に高い相同性(55%)を有するので、これらの蛋白質は作用するエフェクターを共有する可能性がある。従って、本発明の

Gプロテインは発ガン蛋白質であるRASを直接的に、もしくは間接的に制御していると考えられ、RASによる発ガンの抑制剤としての用途が期待される。

(実施例)

以下の実施例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、その要旨を超えない限り以下の実施例によって限定されるものではない。

実施例1

(i) 分子量2.2万のGプロテイン(Smg p 21)の精製(第2表参照)

(a) Kikuchiらの方法(ジャーナル オブザ バイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem.), 263, 2897-2904, 1988)に従い、分子量(相対分子量: Mr) 20,000~25,000の粗Gプロテインを得た。

即ち、まず牛の脳から粗膜画分をコール酸ナトリウムにより抽出し、これをUltragel AcA-44カラムクロマトグラフィーで分画して、GTP結合活性を示した2つのピークのうち

2番目のピークの画分を分取した。これをフェニルセファロースCL-4Bカラムクロマトグラフィーで精製した後、ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーで分画し、1番目のピークの画分を分取した。次いで、これをMono Q HR5/5カラムクロマトグラフィーで分画し、1番目のピークの画分を分取して、Mr 20,000~25,000の粗Gプロテインを得た。

(b) 上記(a)で得た粗Gプロテインを、1mM EDTA、1mMジチオスレイトール、5mM塩化マグネシウム及び0.6%CHAPS(3-((3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホン酸塩: 3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate)を含む50mM酢酸ナトリウム(pH 5.0)緩衝液で平衡化したMono S HR5/5カラムにかけた。5mMの同緩衝液で洗浄後、20mMの塩化ナトリウム(0~1.0M)の濃度勾配にて溶出した。溶出速度は0.5mL/minで行

ない、0.5mLずつ分画した。各画分のGTP結合活性を調べたところ、4つのピークが認められた。その内、4番目のピーク(50~68画分)を集め、1mM EDTA、1mMジチオスレイトール、5mM塩化マグネシウム及び0.5%コール酸ナトリウムを含む20mMトリス-塩酸(pH 9.0)緩衝液9倍量にて希釈後、同緩衝液で平衡化したMono Q HR5/5カラムにかけた。5mMの同緩衝液で洗浄した後、20mMの塩化ナトリウム(0~0.4M)の濃度勾配にて溶出した。溶出速度は0.5mL/minで行ない、0.5mLずつ分画した。その溶出パターンを第2図に示した。分画数10~20番目の画分を集め、SDS-ポリアクリルアミド(8~16%)ゲル電気泳動にかけたところ、分子量が約22Kダルトンの単一バンドであった。かくして、精製されたGプロテイン(Smg p 21)を得た。精製Gプロテイン(Smg p 21)の各種性質は第3表に示す通りであった。

第 2 表

精 製 工 程	ml	全蛋白質 mg	全GTP 結合活性 nmol	比活性 nmol/mg	収 率 %
コルゲナトリウム抽出	95	858	484	0.56	100
Ultrogel AcA-44 (第2ピーク)	200	90	223	2.5	46
フェニルセファロース CL-4B	120	32	142	4.4	29
ヒドロキシアパタイト (第1ピーク)	240	6.8	51	7.5	11
Mono Q HR5/5 (第1ピーク)	8	0.95	10	11	21
Mono S HR5/5 (第4ピーク)	9.5	0.23	4.6	20	0.95
Mono Q HR5/5 (2回目) (第1ピーク)	5.5	0.011	0.36	33	0.074

(2) Gプロテイン (Smg p 21) のアミノ酸配列の決定

(a) プロープの作製

上記(1)で得た精製Gプロテイン (Smg p 21) 25 μ g をセファデックス (Sephadex) G-25 カラムクロマトグラフィーで脱塩した後、0.1%トリフルオロ酢酸で平衡化したYM C pack AP-802 C4カラムにかけた。次いで、アセトニトリル/2-プロパノール (3/7) 0~100%の濃度勾配の0.1%トリフルオロ酢酸40mlにて、1ml/mnの流速で溶出した。得られた画分のGプロテインをAchromobacter lyticusプロテアーゼIで消化し、それをBakerbond W P Octylカラムで分画した。そのうちの1つの画分をガス相シーケンサー (Applied Biosystems 社製、Model 470A) にてアミノ酸配列を決めたところ、下記の通り18アミノ酸からなるペプチドであった。

Asn-Gly-Gln-Gly-Phe-

第 3 表

	Gプロテイン
Mr	22,000
GTP結合活性のKd (nM)	30 \pm 6
GTP加水分解活性 (ターンオーバー数 min ⁻¹)	0.005 \pm 0.002
N-エチルマレイミドのGTP結合活性への影響	阻害される
抗ARFポリクローナル抗体との交叉	しない
抗ras p21モノクローナル抗体との交叉	しない

Ala-Leu-Val-Tyr-Ser-Ile-Thr-Ala-Gln-Ser-Thr-Phe-Asn-

そのうち、Asn-Gly-Gln-Gly-Phe-Alaの配列をもとに、下記塩基配列のオリゴヌクレオチド混合物を化学合成 (Applied Biosystems 社製、Model 380A) してプロープを得た。

5' - G C G A A G C C T T G C C C G T T - 3'
 A A C A A
 T C T C T

次いで、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (東洋紡績社製) 及び γ -³²P-ATP にてその5'末端を³²Pで標識した。

(b) Gプロテイン (Smg p 21) cDNA の調製

牛の大幅よりチオシアン酸グアニジン塩化リチウム法 (カサラ (Cathala) ら、ディー

エヌエイ (DNA), 2, 329, 1983) に従い、ポリ (A) を有する RNA を下記の如く調製した。

即ち、牛大脳 5 g を、直ちに液体窒素にて凍結した。このものを液体窒素とともにワーリングブレンダーに入れ、3, 000 r.p.m. で 2 分間粉碎した。このものを 5 M チオシアン酸グアニジン、10 mM EDTA、50 mM トリシュー塩酸 (pH 7) 及び 8% (V/V) β -メルカプトエタノールからなる溶液 100 ml 中でテフロンホモジェナイザー (5 r.p.m.) にてさらに破砕し、可溶化した。この可溶化物 20 ml を遠心管に入っている 57 M 塩化セシウム溶液 10 ml 上に静かにのせ、Hitachi (日立) RPS 28-2 ローターにて 27, 000 r.p.m. で 20 時間遠心後、RNA を沈殿として回収した。この RNA の沈殿を 0.1% ラウリル硫酸ナトリウム、1 mM EDTA、10 mM トリシュー塩酸 (pH 7.5) からなる溶液 10 ml に溶解し、フェノールクロロホルムで抽出後、エタノール沈殿により回収した。得

られた RNA 約 3.95 mg を 10 mM トリシュー塩酸 (pH 8.0) 及び 1 mM EDTA からなる溶液 1 ml に溶かした。65℃ で 5 分間インキュベートし、0.1 ml の 5 M 塩化ナトリウムを加えた。混合物をオリゴ (dT) セルロース・カラム (ビー・エル・バイオケミカル (P-L Biochemical) 社製) クロマトグラフィー (カラム体積 0.5 ml) にかけた。吸着したポリ (A) を有する mRNA を、10 mM トリシュー塩酸 (pH 7.5) 及び 1 mM EDTA からなる溶液で溶出し、ポリ (A) を有する mRNA 約 100 μ g を得た。

得られたポリ (A) mRNA 約 5 μ g を用い、Amersham 社のマニュアル「cDNA 合成システム」第 13~21 頁及び同「cDNA クローニングシステム λ gt10」第 11~28 頁に記載の方法に従い、牛脳 cDNA ライブラリー (λ gt10 ベクター) を作成した。この cDNA ライブラリーから上記 (a) で得た標識プローブを使用してハイブリダイズするブランクをニトロセ

ルロスフィルター (S&S 社製) D. Hanahan の方法 (Methods in Enzymology (Methods in Enzymology), 100, 333-342, 1983) に従い、オートラジオグラフィーで検出し、G プロテイン (Smg p21) をコードする cDNA が組み込まれた λ gt10 ファージを 1 クローン取得した。

このファージ DNA を Eco RI で消化し、約 2 kb の Eco RI フラグメントを得、これをプラスミド pUC19 (ジーン (Gene), 33, 103-119, 1985) の Eco RI 部位に導入して、G プロテイン (Smg p21) をコードする DNA をクローン化した。このプラスミドを pSmg21 とした。かくして得られた DNA を Sanger のダイデオキシ法 (プロシーディング オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ザ ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 74, 5463-5467,

1977) によりその塩基配列を決定した。その結果を第 3 図に示した。

上記塩基配列から、G プロテイン (Smg p21) の全アミノ酸配列は第 1 図に示す通りであることが分った。

実施例 2

A 発現ベクター及び形質転換体の作成

1) N 末端の変異

① pSmg21 を宝酒造社 1988 年カタログ (p. 82, 83) に記載の方法に従って処理して、10 μ g の 1 本鎖 DNA を得た。

② 変異をさせたい下記の部分のプライマーを、DNA 合成機 (日科機社製、Applied Biosystem MODEL 380A) にて合成した。合成した DNA は濃アンモニア水と 55℃ で一晚反応させ、保護基をはずした後逆相 HPLC により精製して使用した。
プライマー 5'-CGGCCAGTGAAT
TCCAAGCTTATGAGAGAATAT
AAACTAGTGCTCCTTCC-3'

上記プライマー150 pmolをキナーゼ緩衝液(50 mMトリス-HCl (pH 8.0), 10 mM塩化マグネシウム及び5 mMジチオスレイトール) 10 μ lの系で20 uのT4ポリヌクレオチドキナーゼにより5'をリン酸化した。

- ④ ②で5'リン酸化したプライマー8 pmol及び①で得た一本鎖DNA 10 μ gをアマーシャム社のオリゴヌクレオチドを用いた部位特異物 *in vitro*変異体作製システムを用い、アマーシャム社のマニュアル(1988年: p. 25~p. 32)によって変異体を作製した。これにより、プライマーと一本鎖DNAより生じた二本鎖の環状DNAを得ることができた。

この環状DNAを含む水溶液2 μ lを用い、常法に従い大腸菌HB101株を形質転換し、形質転換体を得た。この形質転換体からプラスミドを常法に従い分離・精製し、制限酵素Hind IIIにより切断し、5%アクリルアミドゲル電気泳動により2つのフラグメントに分れたプ

ラスミドを変異プラスミドとして得た。

このようにしてプラスミドpSmg21-1を得た。

- 2) Smg p21 cDNAの発現ベクターへの導入

- ① pSmg21-1 10 μ g (~3 pmol)を、緩衝液H(10 mMトリス-塩酸(pH 7.5), 100 mM塩化ナトリウム及び6 mM塩化マグネシウム) 100 μ l中で、Hind III 20 u、Bgl II 20 uを用い、37℃にて2時間反応させ、切断した。このものを5%アクリルアミドゲル電気泳動にかけ、約700 bpのSmg p21をコードするDNA断片を分離・精製した。・・・フラグメントN

- ② 発現ベクターであるpUSΔH 2 μ g (~1 pmol)を緩衝液H中にてHind III 2 u、Bgl II 2 uを用い、20 μ lの系で37℃2時間反応させ切断した。このものを、同容の水飽和フェノールにより抽出して除蛋白し、エーテルにてフェノールを抽出した後、水に対して

透析を行い、脱塩し、バキュームポンプにより濃縮して、発現ベクター断片HBを含む10 μ lの水溶液を得た。

- ③ フラグメントN 0.5 pmolと発現ベクター断片HB 0.1 pmolとを混合し、10 mMトリス-塩酸(pH 7.5)、1 mMジチオスレイトール、6 mM塩化マグネシウム及び1 mM ATPからなる緩衝液10 μ l中にてT4 DNAリガーゼ1 uを加え、4℃で16時間反応させた。このものを3 μ l使用し、市販の大腸菌JM109コンピテントセルを常法に従い、形質転換した。形質転換体はアンピシリンを20 μ g/ml含むL培地(バクトペプトン10 g/l、イーストエキストラクト5 g/l、塩化ナトリウム10 g/l、寒天15 g/l)にて選択し、特異抗原遺伝子の挿入されている発現ベクターpSmg21-2を得た(第4図)。

B Smg p21の発現

pSmg21-2を保持している大腸菌YA21株をL-ブロスにて、30℃で一晩培養した。

このものを50倍希釈となるようにM9培地(リン酸水素2ナトリウム6 g/l、リン酸2水素カリウム3 g/l、塩化ナトリウム0.5 g/l及び塩化アンモニウム1 g/lでpH 7.4に調整後、1 M硫酸マグネシウム2 mM、20%グリセロール10 mM及び1 M塩化カルシウム0.1 mM)に接種し、2時間、30℃で振とう培養した。次に、IPTG(イソプロピル- β -D-ガラクトピラノシド)を2 mMになるように培地に加え、さらに16時間30℃にて振とう培養を行った後に、6,500 r.p.m.で10分間の遠心分離により集菌した。このものを0.9%塩化ナトリウム及び10 mMトリス-塩酸(pH 7.5)の緩衝液に懸濁し、保存した。

C Smg p21の発現の確認

上記Bで得られた菌体0.3 ml培養分を、10%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(トリス3 g/l、グリシン14.4 g/l及び0.1%SDSからなる緩衝液、120 V、1時間)にかけた後、ゲルを取り出してクマジ・ブリアント・

ブルー（シグマ（Sigma）社製）染色を常法により行った。その結果、IPTGによる誘導をかけないで培養した菌体にはみられない新しいバンドが分子量約22,000の所に検出され、Smg p 21である事が予想された。そのバンドを切り出し、再びそのゲルを同じ緩衝液中で電気泳動させて、蛋白質を緩衝液中へ溶出させた。溶出させた蛋白質をアミノ酸シーケンサー（Applied Biosystems社製）によりN末端より配列を決定した所、20番目までSmg p 21と一致した。

また、得られた蛋白質をニトロセルロースフィルター上で抗Smg p 21マウスモノクローナル抗体と反応させ、洗浄後、ヨードラベルしたプロテインAで標識し、結合能を調べたところ、この蛋白質は抗Smg p 21マウスモノクローナル抗体と結合することが分った。

これらの結果から、得られた蛋白質はSmg p 21であることが確認された。

p 21を産生する形質転換された大腸菌株を得た。

これらの大腸菌株を、10mlのLBブロス（バクトートリプトン10g/l、バクトーイーストエキストラクト5g/l及び塩化ナトリウム10g/l；pH7.5）で30℃で一昼夜培養後、1lのM9培地に接種し、19℃で振とうしながら2時間培養後、2mMとなるようIPTGを加え19℃で一昼夜振とう培養をする事で、可溶性画分に回収されるSmg p 21を産生する事ができる。ここでいう可溶画分とは、培養後集菌し、10mg/lのリソザイム濃度でリソザイム処理を行い、ソニケーター（ブランソン社製）で2分間超音波破砕を行った菌体を0.1%トリトン×100、1.5M塩化ナトリウムの終濃度の液中にて15,000r.p.m.で10分間遠心を行ったものの上清にくる分画をいう。この可溶画分を実施例1と同様にして抗Smg p 21マウスモノクローナル抗体との結合能を調べたところ、この抗体と結合する蛋白質が含まれていることが分った。

実施例3

実施例2で得たプラスミドpSmg 21-2 10μgをBamHI及びBg1IIそれぞれ10ユニットで37℃、2時間保温し、切断した。

反応物を4%ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動し、ゲルから約700bpのBamHI、Bg1II断片を切り出し、精製した。これらとは別に、プラスミドpSmg 21-2 10μgをBamHI 10ユニットで37℃で2時間保温し、切断後アルカリ性ホスファターゼ2ユニットと共に65℃で1時間保温し、末端のリン酸基を除き、その後フェノール抽出し、エタノール沈殿を行い、精製した。このプラスミド0.1μgを、先に精製した約700bpのBamHI、Bg1II断片とT4リガーゼにより結合させた。生成した種々のプラスミドの中からSmg p 21の遺伝子が2個入ったプラスミドpSmg 21-4を得た（第5図）。

pSmg 21-3及びpSmg 21-4でそれぞれ大腸菌YA21株を形質転換して、Smg

実施例4

A. ベクターの作成

10μgのpSmg 21をEcoRI 10ユニットで消化後、0.7%アガロースゲル電気泳動により分離し、約2.5KbpのDNA断片に相当する部分のアガロースゲルを切り出し、凍結融解によりDNAをゲルから抽出した。

抽出したDNAをフェノール抽出及びエタノール沈殿を繰返し行なって精製した。

このDNA 0.5μgを、予めEcoRI消化及びアルカリホスファターゼ処理したpKCRベクター（特開昭61-285990号公報）0.1μgとT4DNAリガーゼ5ユニットの存在下に16℃で一昼夜反応させて、第6図に示す発現ベクターpKCR Smg 21を得た。

B. COS細胞でのSmg 21の発現

上記Aで得たpKCR Smg 21 20μgを、セミコンフルエントな状態に培養したCOS細胞（約 1×10^6 cells）が入っているディッシュ（直径6cm）に添加し、岡山（Okay

ama)らの方法に従って、リン酸カルシウム法 (モレキュラー アンド セルラー バイオロジー (Molecular and Cellular Biology), 17, 2745-2752, 1987) により pKCR Smg21 を、COS細胞に導入した。導入後、CO₂ 雰囲気下、37℃で3昼夜培養し、約 2×10^7 cells の細胞を得た。

得られた培養細胞から、GTC-塩化セシウム法 (「モレキュラー クローニング (Molecular Cloning) 第1版」第188~196頁, 1982年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)) によって、総RNA (約100μg) を得た。

このRNA 20μgを使用し、トマス (Thomas) の方法 (メソッズ イン エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 100, 255-266, 1983、アカデミック プレス (Academic Press

s)) に従い、ノーザン ブロットニングを行なった。その際、プローブとしては、pSmg21 1μgを1ユニットのEcoRI及び1ユニットのBamIで消化して得られた約660bpのDNA断片 (Smg21コーディングプローブ。この断片中にSmg21のコーディング領域が全て含まれている。) をニックトランスレーション法によって³²Pで標識したものを使用した。

比較のために、pKCR Smg21を導入していないCOS細胞を同様に培養し、得られた培養細胞から同様にして調製した総RNAを使用して、ノーザンブロットニングを行なった。

その結果、pKCR Smg21を導入したCOS細胞から得たRNAには、該ベクターを導入していないCOS細胞から得たRNAでは検出されない、約2Kbpよりも長いエキストラ領域にSmg21コーディングプローブとハイブリダイズするRNAが検出された。

従って、pKCR Smg21からSmg21の遺伝子が発現されたことが確認された。

実施例5.

アミノ酸を置換したSmg p21遺伝子 (C1y1⁺→Val¹⁺) 変異体の作成

- (1) 5'-CTAGTGGTCCTTGGATCCGTACGCCGTGGCGAAG-3'の塩基配列を有するDNAをDNAシンセサイザー (ABS社製) により作製し、この合成オリゴマー50pmolを100mMトリス-塩酸 (pH8.0)、10mM塩化マグネシウム、7mMジチオスレイトール及び1mM ATPを含む溶液50μlに溶解させ、T4ポリヌクレオチドキナーゼ2ユニットを加え、37℃で15分間保温し、反応させる。その後70℃で10分間保温し、T4ポリヌクレオチドキナーゼを失活させる。
- (2) pSmg21で形質転換した大腸菌JM109株を20mlの2倍濃度のYT培地 (バクトトリプトン16g/l、バクト イースト エキストラクト10g/l、塩化ナトリウム5g/l、100mg/lアンピシリン及び0.01%

チアミンの存在下、37℃で振とう培養する。OD₆₀₀が0.3に達した時に、ヘルパーファージM13 K07をマルチプリティス オブ インセクシャス (m. o. i.) が2~10で感染させる。その後30分間培養し、これに、カナマイシンを70μg/mlの濃度になるようにして添加した後、10~16時間37℃で培養する。培養後、2000r. p. m. で10分間遠心分離をして、菌体を沈殿させ、上清をとる。この上清に4mlの20%ポリエチレングリコール及び2.5M塩化ナトリウムを加え、4℃で1時間静置した後、3000r. p. m. で30分間遠心分離をして、沈殿を回収する。得られた沈殿を500μlの水に溶かした後、15000r. p. m. で5分間遠心分離し、上清をとる。この上清にフェノールを200μl加え、攪拌後、15000r. p. m. で10分間遠心し、上層を分取する。この上層に、50μlの3M酢酸ナトリウム及び1250μlのエタノールを加え、15000r. p. m.

で10分間遠心分離し、沈殿を回収する。乾燥後50μlの水に溶解し、pSmg21シングルストランドDNA溶液を得る。

- (3) (1)で得たリン酸化オリゴDNAと(2)で得たpSmg21シングルストランドDNAを用いて、オリゴヌクレオチド ディレクテッド イン ビトロ ミュータジェネシス システム (Oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis system) (Amersham社製)で、Amersham社のマニュアルp28〜30に従い、Smg p21の12番目のアミノ酸であるグリシン(Gly)がバリン(Val)でコードされるように変異したSmg p21変異遺伝子が作製される。この変異遺伝子を持つプラスミド(pSmg 21 Val 12)を実施例2に示したpSmg21の場合と同様に処理することにより、大腸菌や動物細胞中で変異Smg p21を発現させることができた。

4 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のGプロテイン(Smg p21)のアミノ酸配列の1例を示す図面である。

第2図は、実施例1におけるMono Q HR5/5カラムクロマトグラフィー(2回目)の溶出パターンを示す図面である。

第3図は、実施例1でクローン化したGプロテインのcDNAの塩基配列を示す図面である。

第4図は、実施例2で作成したプラスミドpSmg21-1及びpSmg21-2の概略図及び作成法の概略を示す図面である。

第5図は、実施例3で作成したプラスミドpSmg21-3及びpSmg21-4の概略図及び作成法の概略を示す図面である。

第6図は、実施例4で作成した発現ベクターpKCR Smg21の構造の概略を示す図面である。

出 願 人 三 菱 化 成 株 式 会 社

代 理 人 弁 理 士 長 谷 川 一

ほか1名

第1図(その1)

```

1      5      10
Met-Arg-Glu-Tyr-Lys-Leu-Val-Val-Leu-Gly-
11     15     20
Ser-Gly-Gly-Val-Gly-Lys-Ser-Ala-Leu-Thr-
21     25     30
Val-Gln-Phe-Val-Gln-Gly-Ile-Phe-Val-Glu-
31     35     40
Lys-Tyr-Asp-Pro-Thr-Ile-Glu-Asp-Ser-Tyr-
41     45     50
Arg-Lys-Gln-Val-Glu-Val-Asp-Cys-Gln-Gln-
51     55     60
Cys-Met-Leu-Glu-Ile-Leu-Asp-Thr-Ala-Gly-
61     65     70
Thr-Glu-Gln-Phe-Thr-Ala-Met-Arg-Asp-Leu-
71     75     80
Tyr-Met-Lys-Asn-Gly-Gln-Gly-Phe-Ala-Leu-
81     85     90
Val-Tyr-Ser-Ile-Thr-Ala-Gln-Ser-Thr-Phe-
91     95     100
Asn-Asp-Leu-Gln-Asp-Leu-Arg-Glu-Gln-Ile-
101    105    110
Leu-Arg-Val-Lys-Asp-Thr-Glu-Asp-Val-Pro-
111    115    120
Met-Ile-Leu-Val-Gly-Asn-Lys-Cys-Asp-Leu-

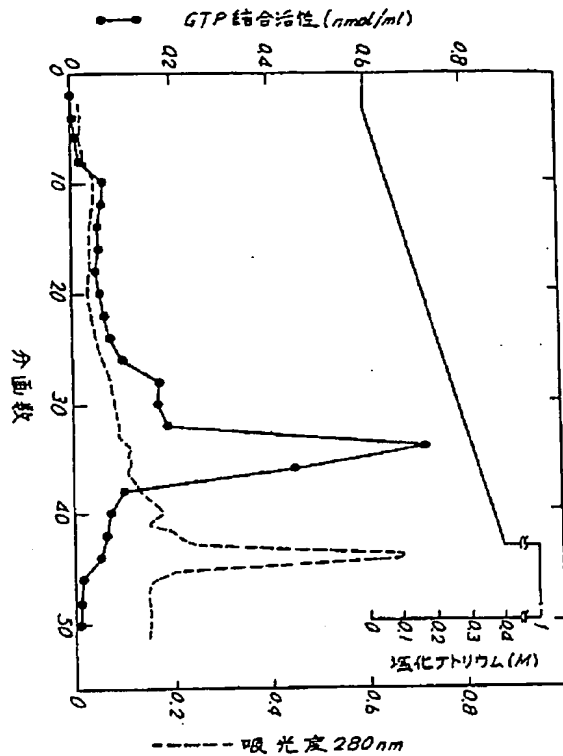
```

第1図(その2)

```

121    125    130
Glu-Asp-Glu-Arg-Val-Val-Gly-Lys-Glu-Gln-
131    135    140
Gly-Gln-Asn-Leu-Ala-Arg-Gln-Trp-Cys-Asn-
141    145    150
Cys-Ala-Phe-Leu-Glu-Ser-Ser-Ala-Lys-Ser-
151    155    160
Lys-Ile-Asn-Val-Asn-Glu-Ile-Phe-Tyr-Asp-
161    165    170
Leu-Val-Arg-Gln-Ile-Asn-Arg-Lys-Thr-Pro-
171    175    180
Val-Glu-Lys-Lys-Lys-Pro-Lys-Lys-Lys-Ser-
181    184
Cys-Leu-Leu-Leu

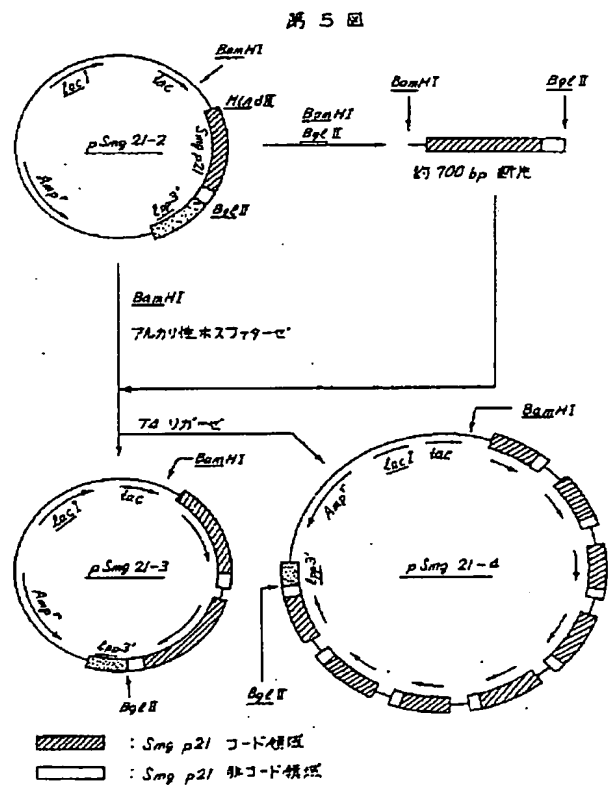
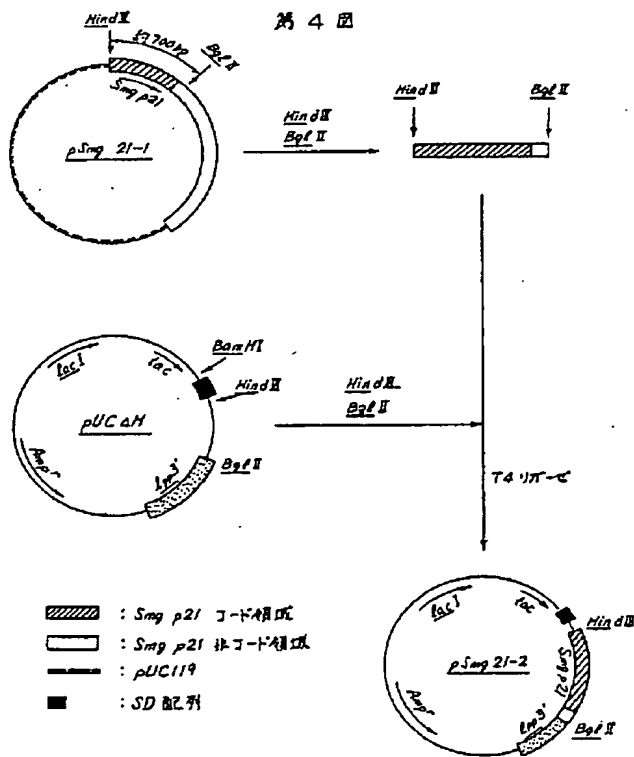
```



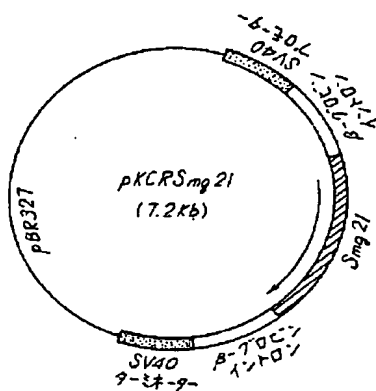
第 2 図

第 3 図

CCACATCCTCGTCAAGTACAGTGGTCTTGGTTCAGGAGCGTGGGGAAGTCTGC
 TCTGACAGTTTCAGTCTGCTGAGGAAATTTTGTGAAAAATATGACCAACGATAGAGA
 TTCTACAGAAAGCAAGTTGAAGTAGACTGCCAACAGTGTATGCTCGAAATCTGGACAC
 AGCGGACACAGAGCAATTTACAGCAATGAGGCAATTTGTATATGAAGAATGGCCAGGGTT
 TGACCTAGTATATCTATTACCGTCACTCCACATTTAATGACTTACAGACCTGAGGGA
 ACAGATTTTACGAGTTAAGGACACAGAGATGTTCGAATGATTTTGGTTGGCAATAAGTG
 TGACCTGGAAGACGAGCGAGTAGTTGGCAAGAACAGGGTCCAGAAATTTAGCAAGACAGTG
 GTGTAAGTGTGCTTTTAGAATCTCTGCAAGTCAAGAGATCAACGTTAATAGATATT
 TTATGACCTGGTCAGACAGATAAATAGAAAAACACCCAGTGGAAAGAGAGAGCGCTAAAAA
 GAAATCGTGTCTGCTTTAGACCCAGTAAAGCAGCGCTCTGAGCCAGATTACAGGA
 ATGAGAAACTGTGCTTAATTTGGAAGTGGCCAGCAATCCATCTTCAAAAAATAAATCTGA
 AGAGGCTTCCTGCTTTTATATTTATATGAGAAATTTAGATCTTATATTGTTTGCACA
 AGTTCCCTGGAGAAAGAAATGCTCTGTGTATCTCTTGGAAAAATAGACAATAGTATT
 TCTCCTTTGCAATAGCAGTTATAA



第 6 図



第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. 5
// A 61 K 37/02
C 12 N 15/12
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:19)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:91)

識別記号
ADU

庁内整理番号
8615-4C

優先権主張 ②昭63(1988)11月11日③日本(JP)④特願 昭63-284860
⑦発明者 松井 理恵 神奈川県横浜市緑区鶴志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**